

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 08 OCT 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 40 260.8

Anmeldetag: 29. August 2003

Anmelder/Inhaber: Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich/DE

Bezeichnung: Mittel und Verfahren zur Behandlung und Prävention von TSE, sowie Verfahren zur Herstellung des Mittels

IPC: A 61 K, C 12 N, A 61 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 23. September 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag


Dzlerzon

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



B e s c h r e i b u n g

Mittel und Verfahren zur Behandlung und Prävention von
TSE, sowie Verfahren zur Herstellung des Mittels

Die Erfindung betrifft ein Mittel und ein Verfahren zur
Behandlung und zur Prävention von TSE, sowie ein Ver-
fahren zur Herstellung des Mittels.

5 Das Auftreten der transmissiblen spongiformen Enzepha-
lopathie (TSE) wird nach Ergebnissen der jüngeren medi-
zinschen Forschung ursächlich mit Prionen in Verbin-
dung gebracht. Die Krankheit zeichnet sich durch
schwammartige Veränderungen im Gehirn aus. Als Haupt-
Krankheitserreger wurden Prione identifiziert. Prione
10 bestehen überwiegend aus Prionprotein (PrP) in einer
pathogenen Konformation (PrP^{Sc}). Auch der gesunde Orga-
nismus produziert Prionprotein, allerdings in einer
nicht pathogenen, ungefährlichen Konformation (PrP^C).
PrP^C und PrP^{Sc} besitzen die gleiche Aminosäuresequenz,
15 zeigen jedoch einen erheblichen Unterschied in der Se-
kundärstruktur. PrP^C enthält einen relativ hohen
 α -helikalen Anteil und fast keine β -Faltblatt-Elemente.
PrP^{Sc} hingegen weist mit einem erhöhten β -Faltblatt-
Anteil und geringeren α -Helix-Anteil eine von PrP^C ver-
20 schiedene Sekundärstruktur auf. Demnach handelt es sich
bei PrP^C und PrP^{Sc} um Strukturisomere. Außerdem ist
PrP^{Sc} im Gegensatz zu PrP^C resistent gegen Proteinase-
K-Verdau. Dabei scheint PrP^{Sc} posttranslational aus PrP^C
gebildet zu werden. Entstehung und Entwicklung der
25 Krankheit sind abhängig von der fortgesetzten Umwand-

lung von PrP^{C} in PrP^{Sc} . Die Faktoren die für die Umwandlung von PrP^{C} in PrP^{Sc} verantwortlich sind, sind noch nicht alle bekannt.

6

Alle bisher verfolgten Ansätze zu einer TSE-Therapie haben die Suche nach Wirkstoffen zum Ziel, die gezielt und spezifisch an PrP^{Sc} binden oder dessen Bindung an PrP^{C} blockieren sollen, wie es in der Veröffentlichung von C.Soto Biochem. Soc. Trans. 2002 Aug. 30(4): 569-574 zusammengefasst wird.

10

Es ist daher die Aufgabe der Erfindung einen pharmazeutischen Wirkstoff und ein alternatives Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit denen die Krankheit TSE geheilt, gelindert oder präventiv behandelt werden kann.

15

Überraschenderweise wurde gefunden, dass eine Verlangsamung und sogar Inhibierung der PrP^{Sc} -Bildung bewirkt werden kann, wenn prioninfizierten Zellen bestimmte Peptide, zugeführt werden. Hierbei wird angenommen, dass sich die erfindungsgemäßen Peptide an das PrP^{C} anlagern und so die Umwandlung von natürlich vorkommendem PrP^{C} in das pathogene PrP^{Sc} Verhindern. Es wurden erfindungsgemäß verschiedene Peptide mit teilweise charakteristischen Aminosäure - Untersequenzblöcken identifiziert, die eine Linderung der Symptomatik oder sogar eine Heilung der Krankheit TSE zur Folge haben. Beispielhafte Peptide sind in den Sequenzen 1 bis 27 angegeben. Als erfindungsgemäß einsetzbare Peptide wurden folgende Sequenzen identifiziert, die in Richtung Amino- zu Carboxylterminus zu lesen sind, von denen eine

20

25

Komponente oder ein Gemisch aus mindestens zwei Komponenten zur Behandlung eingesetzt werden können:

Alle Sequenzen die mindestens eine Komponente aus mindestens einer der Gruppen bestehend aus

- 5 A) Val und Asp, Met und Ile, Asp und Val, Gln und Pro, Thr und Pro, Leu und Asp, Asp und Ser, Arg und His, Thr und Tyr, Val und Tyr, Arg und Pro, Pro und Leu, Leu und Pro, Pro und Ser, Ser und Pro, Leu und Lys, Lys und Ala, Ala und Thr, Thr und Thr, Thr und Asn, Asn und Ser, Ser und Lys, Lys und Leu, Leu und Met, Met und Met, Met und Tyr, Trp und His, His und Trp, Trp und Gln, Gln und Trp, Trp und Thr, Thr und Pro, Pro und Trp, Trp und Ser, Ser und Ile, Ile und Gln, Gln und Pro.
- 10
- 15 B) Leu und Asp und Ser, Val und Asp und Met, Asp, Met und Ile, Met, und Ile und Asn, Asp und Val und Gln, Val und Gln und Pro, Gln und Pro und Leu, Gln und Pro und Met, Pro und Leu und Thr, Leu und Thr und Pro, Leu und Asp und Ser, Asp und Ser und Ser, Asp und Ser und Cys, Arg und His und Ala, His und Ala und Thr, Ala und Thr und Tyr, Val und Tyr und Ser, Tyr und Ser und Ser, Arg und Pro und Leu, Pro und Leu und Pro, Leu und Pro und Ser, Pro und Ser und Pro, Leu und Lys und Ala, Lys und Ala und Thr, Ala und Thr und Thr, Thr und Thr und Asn, Thr und Asn und Ser, Asn und Ser und Lys, Ser und Lys und Leu, Lys und Leu und Met, Leu und Met und Met, Met und Met und Tyr, Trp und His und Trp, His und Trp und Gln, Trp und Gln und Trp, Gln und trp und Thr, Trp
- 20
- 25

und Thr und Pro, Thr und Pro und Trp, Pro und Trp
und Ser, Trp und Ser und Ile, Ser und Ile und Gln,
Ile und Gln und Pro.

5

10

15

20

25

30

C) Val und Asp und Met und Ile, Asp und Val und Ile und
Pro, Leu und Asp und Ser und Ser, Arg und His und
Ala und Thr, His und Ala und Thr und Tyr, Val und
Tyr und Ser und Ser, Arg und Pro und Leu und Pro,
Pro und Leu und Pro und Ser, Leu und Pro und Ser und
Pro, Leu und Lys und Ala und Thr, Lys und Ala und
Thr und Thr, Ala und Thr und Thr und Asn, Thr und
Thr und Asn und Ser, Thr und Asn und Ser und Lys,
Asn und Ser und Lys und Leu, Ser und Lys und Leu und
Met, Lys und Leu und Met und Met, Leu und Met und
Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln, His und
Trp und Gln und Trp, Trp und Gln und Trp und Thr,
Gln und Trp und Thr und Pro, Trp und Thr und Pro und
Trp, Thr und Pro und Trp und Ser, Pro und Trp und
Ser und Ile, Trp und Ser und Ile und Gln, Ser und
Ile und Gln und Pro.

D) Val und Asp und Met und Ile und Asn, Asp und Met und
Ile und Asn und Asp, Met und Ile und Asn und Asp und
Val, Ile und Asn und Asp und Val und Gln, Asn und
Asp und Val und Gln und Pro, Asp und Val und Gln und
Pro und Leu, Asn und Asp und Val und Gln und Pro,
Asp und Val und Gln und Pro und Leu, Val und Gln und
Pro und Leu und Thr, Gln und Pro und Leu und Thr und
Pro, Leu und Asp und Ser und Ser und Arg, Arg und
His und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala und
Thr und Thr, Lys und Ala und Thr und Thr und Asn,
Ala und Thr und Thr und Asn und Ser, Thr und Thr und

5 Asn und Ser und Lys, Thr und Asn und Ser und Lys und
Leu, Asn und Ser und Lys und Leu und Met, Ser und
Lys und Leu und Met und Met, Lys und Leu und Met und
Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln und Trp,
His und Trp und Gln und Trp und Thr, Trp und Gln und
Trp und Thr und Pro, Gln und Trp und Thr und Pro und
Trp, Trp und Thr und Pro und Trp und Ser, Trp und
Thr und Pro und Trp und Ile, Thr und Pro und Trp und
Ile und Gln, Pro und Trp und Ile und Gln und Pro.

10 E) Val und Asp und Met und Ile und Asn und Asp, Val und
Gln und Pro und Leu und Thr und Pro, His und Ser und
Pro und Leu und Asp und Ser, Ser und Arg und His und
Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala und Thr und
Thr und Asn, Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und
15 Ser, Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys,
Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu, Thr und
Asn und Ser und Lys und Leu und Met, Asn und Ser und
Lys und Leu und Met und Met, Ser und Lys und Leu und
Met und Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln und
20 Trp und Thr, Trp und Gln und Trp und Thr und Pro und
Trp, Trp und Thr und Thr und Pro und Trp und Ser und
Ile, Pro und Trp und Ser und Ile und Gln und Pro.

25 F) Asp und Val und Gln und Pro und Leu und Thr und Pro,
Leu und Asp und Ser und Ser und Arg und His und Ala,
Ser und Ser und Arg und His und Ala und Thr und Tyr,
Leu und Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und Ser,
Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys,
Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu,
Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu und Met,
30 Thr und Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met,

Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met und Tyr,
Trp und His und Trp und Gln und Trp und Thr und Pro,
Gln und Trp und Thr und Pro und Trp und Ser und Ile,
Thr und Pro und Trp und Ser und Ile und Gln und Pro.

5 G) Mindestens zwei Komponenten aus mindestens einer der Gruppen A) bis F).

10 H) Sequenzen 1 - 27 des Sequenzprotokolls, welche alle 12 Aminosäuren mit den Positionen 1 - 12 umfassen, sind oder enthalten. Diese Sequenzen können eine beliebige Länge haben, vorzugsweise eine Länge von 6 - 40, besonders bevorzugt 8 - 30, 10 - 20 oder noch bevorzugter 10-12 Aminosäuren lang sein.

15 In einigen speziellen Ausführungsformen können die folgenden Sequenzen vorliegen, die vorzugsweise 12 Aminosäuren lang sind.

I) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1, 2, 3 und 4 die Aminosäuren Leu, Lys, Ala, und Thr beinhalten.

20 J) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 6, 7, 8 und 9 die Aminosäuren Asn, Ser, Lys und Leu besitzen.

K) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination der Merkmale I) und J) beinhalten.

25 L) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 4, 5 und 6 die Aminosäuren Gln, Trp und Thr besitzen.

M) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 8 und 9 die Aminosäuren Arg und His besitzen.

N) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 11 und 12 die Aminosäuren Thr und Tyr besitzen.

5 O) Alle Unterkombinationen mit 2 oder 3 Elementen der Gruppen L), M) und N).

P) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1 und 2 die Aminosäuren Val und Tyr besitzen.

10 Q) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 7, 8, 9, 10, 11, 12 die Aminosäuren Arg, Pro, Leu, Pro, Ser und Pro besitzen K Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met.

R) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination aus N) und O) darstellen.

15

Die Sequenzabschnitte I) - R) können in Sequenzen enthalten sein, die beispielsweise eine Länge von 6 - 40, bevorzugt 8 - 30, 10 - 20 und besonders bevorzugt 10 - 12 Aminosäuren umfassen.

20

Die erfindungsgemäßen Peptide, welche eine Heilung von TSE oder eine Linderung bewirken, können nach bekannten Verfahren hergestellt werden.

25

So kann zur Herstellung eines chemisch-synthetischen Verfahrens zum Beispiel Festphasensynthesen oder eine Synthese in flüssigem Medium herangezogen werden. Bei der Festphasensynthese werden die Aminosäuren in der

Abfolge der Sequenz entsprechend den Sequenzprotokollen und der Auflistungen A) - R) miteinander verbunden. Die Festphasenpeptidsynthese besteht aus drei wesentlichen Schritten:

- 1) Aufbau der Aminosäurekette zum Peptid,
- 2) Spaltung des synthetisierten Peptids vom Harz und
- 3) Gegebenenfalls Reinigung und Charakterisierung.

Für die Synthese der Aminosäurekette sind unterschiedliche Kopplungsmethoden bekannt, wie Sie beispielsweise in „Beyer Walter“ 22. Auflage ISBN 3-7776-0485-2, Seiten 829 - 834 beschrieben werden.

Die Peptide können auch durch Expression der für sie kodierenden Nukleotidsequenzen, zum Beispiel in Chromosomen, Plasmiden oder anderen Informationsträgern, nackte DNA oder RNA in Organismen, in Zellen oder zellfreien Systemen, hergestellt werden.

Gegenstand der Erfindung sind daher auch die Nukleinsäuren, welche für die Peptide gemäß den Aminosäuresequenzen A) - R) kodieren, einschließlich aller Allelvariationen sowie die Nukleotidsequenzen der Sequenzfolgen 1 - 27 einschließlich aller Allelvariationen.

Mit den erfindungsgemäßen Peptiden können alle Säugetiere einschließlich Menschen behandelt bzw. geheilt werden und die Peptide können auch zur Prävention eingesetzt werden. Besonders bevorzugt ist die Behandlung des Menschen es können aber auch Rinder und Schafe behandelt werden. Die erfindungsgemäßen Peptide lagern an das PrP^C aller Säuger an, so dass die erfindungsgemäße Wirkung stattfinden kann. Der erfindungsgemäße Effekt

findet auch statt, wenn mindestens zwei der genannten Peptide an das PrP^c binden.

Mit den erfindungsgemäßen Peptiden kann eine Behandlung der Krankheit TSE sowohl beim Menschen als auch bei Tieren vorgenommen werden. Zu den humanen Erkrankungen gehören das Creutzfeld-Jakob-Syndrom, Kuru, Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom und FFI (Fatal Familial Insomnia). Beim Tier sind ebenfalls TSE- Erkrankungen bekannt, z. B. beim Schaf Scrapie, beim Rind bovine spongiforme encephatlopathie (BSE) bei Wildtieren chronic wasting disease (CWD).

Hierzu müssen die erfindungsgemäßen Peptide so appliziert werden, dass sie ihren Wirkort erreichen. Dieser Wirkort kann das Gehirn, das Rückenmark und/oder das gesamte Nervensystem sein, aber auch jeder andere Teil des Organismus. Hierzu können die erfindungsgemäßen Peptide in fester oder in einem Lösungsmittel, vorzugsweise Wasser gelöster Form in den Körper eingebracht werden. Als Feststoff können die Peptide beispielsweise oral, rektal oder als Pulver in die Nase eingeführt werden.

Der erfindungsgemäße Wirkstoff und die pharmazeutische Zusammensetzung können als flüssige, halbfeste oder feste Arzneiformen und in Form von z. B. Injektionslösungen, Tropfen, Säften, Sirupen, Spray, Suspensionen, Granulaten, Tabletten, Pellets, transdermalen therapeutischen Systemen, Kapseln, Pflastern, Zäpfchen, Salben, Cremes, Lotionen, Gelen, Emulsionen oder Aerosolen vorliegen und verabreicht werden und enthalten die erfindungsgemäßen Peptide in einer physiologisch verträglichen Form und in Abhängigkeit des Applikationsweges

pharmazeutische Hilfsstoffe, wie z. B. Trägermaterialien, Füllstoffe, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, oberflächenaktive Stoffe, Farbstoffe, Konservierungsstoffe, Sprengmittel, Gleitmittel, Schmiermittel, Aromen und/oder Bindemittel. Diese Hilfsmittel können beispielsweise sein: Wasser, Ethanol, 2-Propanol, Glycerin, Fructose, Laktose, Saccharose, Dextrose, Melasse, Stärke, modifizierte Stärke, Gelatine, Sorbitol, Inositol, Mannitol, mikrokristalline Cellulose, Methylcellulose, Carboxymethylcellulose, Celluloseacetat, Schellack, Cetylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Paraffine, Wachse, natürliche und synthetische Gummis, Akaziengummi, Alginate, Dextran, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, Stearinsäure, Magnesiumstearat, Zinkstearat, Glycerylstearat, Natriumlaurylsulfat, genießbare Öle, Sesamöl, Kokosnussöl, Erdnussöl, Sojabohnenöl, Lecitin, Natriumlactat, Polyoxyethylen- und -propylenfettsäureester, Sorbitanfettsäureester, Sorbinsäure, Benzoessäure, Zitronensäure, Ascorbinsäure, Tanninsäure, Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Magnesiumoxid, Zinkoxid, Siliciumoxid, Titanoxid, Titandioxid, Magnesiumsulfat, Zinksulfat, Calciumsulfat, Pottasche, Calciumphosphat, Dicalciumphosphat, Kaliumbromid, Kaliumjodid, Talkum, Kaolin, Pectin, Crospovidon, Agar und Bentonit.

Die Auswahl der Hilfsstoffe sowie der einzusetzenden Mengen derselben hängt davon ab, ob das Medikament oral, subkutan, parenteral, intravenös, pulmonal, intraperitoneal, transdermal, intramuskulär, nasal, buccal, rektal oder auf andere geeignete Weise appliziert werden soll. Für die orale Applikation eignen

sich u. a. Zubereitungen in Form von Tabletten, Dra-
gees, Kapseln, Granulaten, Tropfen, Säften und Sirupen,
für die parenterale, topische und inhalative Applikati-
on Lösungen, Suspensionen, leicht rekonstruierbare Pul-
5 ver zur Inhalation sowie Sprays. In geeigneten perkuta-
nen Applikationsformen kann der Wirkstoff in einem De-
pot in gelöster Form oder in einem Pflaster, gegebenen-
falls unter Zusatz von Hautpenetrationen fördernden
Mitteln, vorliegen. Rektal, transmucosal, parenteral,
10 oral oder perkutan anwendbare Zubereitungsformen können
die erfindungsgemäßen Peptide verzögert freisetzen.

In flüssiger Form können die erfindungsgemäßen Peptide
beispielsweise intravenös, oral, als Nasenspray, subku-
tan, intramuskulär, inhalativ oder in oder neben das
15 Rückenmark appliziert werden. Weiterhin können die er-
findungsgemäßen Wirkstoffe mittels Salben oder Cremes
aufgebracht werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können am Wirkort oder an
anderen Orten des Organismus entstehen, nachdem Nuk-
20 leinsäuren (DNA und RNA oder eine Kombination davon),
die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren, in den
Organismus eingebracht werden. Dies kann durch virale
Vektoren, nackte Nukleinsäure (DNA, RNA), Plasmide,
künstliche Viruspartikel, Liposomen erreicht werden,
25 die intravenös, intranasal, oral, rektal, subkutan, in-
tramuskulär, in oder an das Rückenmark in den Körper
eingebracht werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können auch zur Präven-
tion der oben genannten Krankheiten verwendet werden.
30 Hierzu müssen die erfindungsgemäßen Peptide so appli-

ziert werden, dass sie ihren Wirkort erreichen. Dieser Wirkort kann das Gehirn, das Rückenmark und/oder das gesamte Nervensystem sein, aber auch jeder andere Teil des Organismus. Hierzu können die erfindungsgemäßen Peptide in fester oder in einem Lösungsmittel, (vorzugsweise Wasser) gelöster Form in den Körper eingebracht werden. Als Feststoff können die Peptide beispielsweise oral, rektal oder als Pulver in die Nase eingeführt werden.

In flüssiger Form können die erfindungsgemäßen Peptide beispielsweise intravenös, oral, als Nasenspray, subkutan, intramuskulär, inhalativ oder in bzw. neben das Rückenmark appliziert werden. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe mittels Salben oder Cremes aufgebracht werden.

Die erfindungsgemäßen Peptide können am Wirkort oder an anderen Orten des Organismus entstehen, nachdem Nukleinsäuren (DNA und RNA oder eine Kombination davon) die für die erfindungsgemäßen Peptide kodieren in den Organismus eingebracht werden. Dies kann erreicht werden durch virale Vektoren, nackte Nukleinsäuren (DNA, RNA), Plasmide, künstliche Viruspartikel, Liposomen, die intravenös, intranasal, oral, rektal, subkutan, intramuskulär, in oder an das Rückenmark in den Körper eingebracht werden.

Zur Verbesserung der Bindungs-, Lösungs-, und Wirkeigenschaften können die erfindungsgemäßen Peptide noch modifiziert werden, so dass die Wasserlöslichkeit, deren Stabilität, die Bioverfügbarkeit und die Affinität zum Anhaften am PrP^{C} vergrößert wird. Diese Modifikati-

onen können beispielsweise Zuckerreste, Glukoronsäuren, Sulfatreste, Serin, Glycin oder Aspartat sein.

5 Weiterhin können die erfindungsgemäßen Peptide mit Antikörpern oder Fragmenten davon auf übliche Weise verknüpft werden, um bei einer therapeutischen Anwendung des erfindungsgemäßen Proteins Bestandteile des Immunsystems zu aktivieren.

10 Als zu behandelnde Krankheitsbilder können das Creutzfeld-Jakob-Syndrom, Kuru, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom sowie Fatal Familia Insomnia (FFI) beispielhaft genannt werden.

Methodisches:

15 Phagendisplay ist eine Technik, die es ermöglicht Peptid-Bibliotheken mit randomisierten Aminosäuresequenzen zu konstruieren und diese nach Liganden für ein bestimmtes Zielmolekül zu durchsuchen. Die Peptidbibliothek ist dabei als Fusion aus Peptid und einem Phagenhüllprotein auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert ("phage display"). Die Diversität der präsentierten Peptide wird durch die Insertion einer kombinatorisch mutierten DNA als Peptid-kodierender Teil des Fusionsgens erreicht. Auf diese Weise wird eine extrem große Zahl von Phagen erzeugt, wobei jeder Phage ein
20 anderes Peptid präsentiert. Das Konstruieren, Vermehren und Selektieren wird als "Biopanning" bezeichnet. Die Bibliothek wird mit einem immobilisierten Zielmolekül inkubiert, wobei der nicht-bindende Teil der Peptid-Bibliothek gewaschen und der bindende Teil anschlie-

5 Send eluiert wird. Die dadurch angereicherte Population
von Phagen, die ein mit dem Zielmolekül interagierendes
Peptid präsentieren, werden amplifiziert, indem man mit
ihnen Bakterien infiziert. Die Screening-
10 Amplifikations-Prozedur kann mehrmals wiederholt wer-
den, um die Bibliotheks-Mitglieder weiter anzureichern,
die eine relativ höhere Affinität zum Zielmolekül be-
sitzen. Das Ergebnis ist eine Peptid-Population, die
dominiert wird von den Aminosäuresequenzen, die das
15 Zielmolekül am besten binden.

Verwendet wurde eine kommerzielle Phagenbibliothek mit
12 randomisierten Aminosäuren (New England Biolabs,
Frankfurt). Hier ist an das Phagenhüllprotein kodieren-
de gp3-Gen nach der Signalsequenz N-terminal die Bib-
liothek inseriert. Diese besteht aus $1,9 \times 10^9$ unabhän-
20 gen Klonen und ist so amplifiziert und konzentriert,
dass in 10 μ l durchschnittlich jede Sequenz in 55 Ko-
pien vorliegt.

Zur Durchführung der Selektion gegen das rekombinante
20 Prionprotein (rPrP) aus Hamster wurde rekombinant her-
gestelltes Hamster-Prionprotein in einer Konzentration
zwischen 0,01 μ g/ml und 0,1 μ g/ml in PBS mit 0,2% SDS, pH
7,2 mit Hilfe des "Protein Immobilizer Kit" (Exiqon) in
einer Mikrotiterplattenvertiefung immobilisiert. Hier-
25 für wurden jeweils 100 μ l Proteinlösung für 2 Stunden
unter sanftem Schütteln inkubiert. Nach Entfernen der
Lösung wurde 3 mal mit 200 μ l PBS gewaschen.

Für die Selektion wurden 10 μ l Phagen der kommerziellen
Phagenbibliothek in 100 μ l PBST mit 0,1% BSA 10 Minuten

unter leichtem Schütteln in einer rPrP-beschichteten Mikrotiterplattenvertiefung inkubiert. Die nicht gebundenen Phagen wurden verworfen und anschließend 10 mal mit 300 µl PBST gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 µl 0,2 M Glycin-HCl, pH 2,2 für 10 Minuten unter leichtem Schütteln. Das Eluat wurde in 15 µl Tris-HCl, pH 9, 1 neutralisiert.

Das Eluat wurde in 20 ml *E. coli*-Kultur gegeben und für 4,5 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und 1/6 Volumen PEG/NaCl zugegeben. Der Ansatz wurde nun über Nacht bei 4 °C gefällt. Danach wurde 20 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und 1/6 Volumen PEG/NaCl zugegeben. Der Ansatz wurde 1 Stunde auf Eis gefällt. Abschließend wurde 60 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 100 µl TBS resuspendiert. Die so erhaltenen Phagen konnten nun in der nächsten Runde eingesetzt werden. Insgesamt wurden fünf Selektionsrunden durchgeführt. Anschließend wurden willkürlich ausgewählte Phagenklone isoliert und die Aminosäuresequenz der auf diesen Phagen präsentierten Peptide über den Umweg der DNA-Sequenzierung des im Phagengenom kodierten Peptids bestimmt. Das Ergebnis sind die insgesamt 27 verschiedenen Aminosäuresequenzen im Sequenzprotokoll.

In einem Zellkulturessay mit infizierten N2a-Zellen wurde gezeigt, dass alle untersuchten Peptide in der

Lage waren, die Menge an gebildetem PrP^{Sc} zu verringern..

Beispiel:

Versuchsbeschreibung

- 5 Prion infizierte Zellen werden eine Woche lang kultiviert und dann auf die Bildung von PrP^{Sc} hin untersucht. Dies funktioniert so, dass man die Zellen lysiert und mit 20 µg/ml Proteinase K (PK) behandelt. Dadurch wird PrP^C verdaut und nur das PK-resistente PrP^{Sc} bleibt übrig. Das PK-behandelte Zelllysats wird einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterworfen und auf eine Membran geblottet und anschließend mit einem PrP-spezifischen Antikörper angefärbt ("Western-Blot"). Figur 1 zeigt das Bandenmuster des PK-behandelten Zelllysats. Die Peptide W1, W2, W3 und W4 entsprechen dabei den Sequenzen 8,2,10 und 1 gemäß dem Sequenzprotokoll. Dabei entsteht ein typisches Bandenmuster (siehe Spur 1 in der unteren Abbildung).
- 10
- 15
- 20 In Anwesenheit von Substanzen, die die Vermehrung von Prionen inhibieren (Quinacrine als positive Kontrolle) ist kein oder ein deutlich schwächeres Bandenmuster zu sehen (Spur 2 und 3).
- 25 Bei Behandlung der Prion infizierten N2a-Zellen mit den Peptiden W1, W2, W3 und W4 ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der PrP-Banden im Westernblot zu sehen (übrige Spuren). Das bedeutet, dass die Peptide inhibierend auf die Replikation der Prionen wirken.

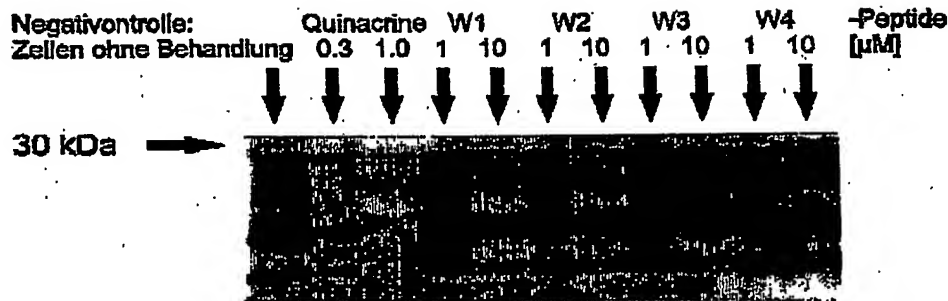


Fig.1

Hier die Aminosäuresequenzen (im Einbuchstabencode) der vier wirksamen Peptide, die im Phagendisplay-Screening identifiziert wurden:

"W1" HSPLDSSRHATY = Seq.Nr.8
"W2" VDMINDVQPLTP = Seq.Nr.2
"W3" VYSSTTRPLPSP = Seq.Nr.10
"W4" LKATTNSKLMMY = Seq.Nr.1

Patentansprüche

1. Mittel,
dadurch gekennzeichnet,
dass es mindestens eine Komponente aus mindestens
einer der Gruppen A) bis R) ist oder umfasst:

5 A) Val und Asp, Met und Ile, Asp und Val, Gln
und Pro, Thr und Pro, Leu und Asp, Asp und
Ser, Arg und His, Thr und Tyr, Val und Tyr,
10 Arg und Pro, Pro und Leu, Leu und Pro, Pro
und Ser, Ser und Pro, Leu und Lys, Lys und
Ala, Ala und Thr, Thr und Thr, Thr und Asn,
Asn und Ser, Ser und Lys, Lys und Leu, Leu
und Met, Met und Met, Met und Tyr, Trp und
15 His, His und Trp, Trp und Gln, Gln und Trp,
Trp und Thr, Thr und Pro, Pro und Trp, Trp
und Ser, Ser und Ile, Ile und Gln, Gln und
Pro.

20 B) Leu und Asp und Ser, Val und Asp und Met,
Asp, Met und Ile, Met, und Ile und Asn, Asp
und Val und Gln, Val und Gln und Pro, Gln und
Pro und Leu, Gln und Pro und Met, Pro und Leu
und Thr, Leu und Thr und Pro, Leu und Asp und
Ser, Asp und Ser und Ser, Asp und Ser und
Cys, Arg und His und Ala, His und Ala und
25 Thr, Ala und Thr und Tyr, Val und Tyr und
Ser, Tyr und Ser und Ser, Arg und Pro und
Leu, Pro und Leu und Pro, Leu und Pro und

21

5

Ser, Pro und Ser und Pro, Leu und Lys und
Ala, Lys und Ala und Thr, Ala und Thr und
Thr, Thr und Thr und Asn, Thr und Asn und
Ser, Asn und Ser und Lys, Ser und Lys und
Leu, Lys und Leu und Met, Leu und Met und
Met, Met und Met und Tyr, Trp und His und
Trp, His und Trp und Gln, Trp und Gln und
Trp, Gln und trp und Thr, Trp und Thr und
Pro, Thr und Pro und Trp, Pro und Trp und
Ser, Trp und Ser und Ile, Ser und Ile und
Gln, Ile und Gln und Pro.

10

C) Val und Asp und Met und Ile, Asp und Val und
Ile und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser, Arg
und His und Ala und Thr, His und Ala und Thr
und Tyr, Val und Tyr und Ser und Ser, Arg und
Pro und Leu und Pro, Pro und Leu und Pro und
Ser, Leu und Pro und Ser und Pro, Leu und Lys
und Ala und Thr, Lys und Ala und Thr und Thr,
Ala und Thr und Thr und Asn, Thr und Thr und
Asn und Ser, Thr und Asn und Ser und Lys, Asn
und Ser und Lys und Leu, Ser und Lys und Leu
und Met, Lys und Leu und Met und Met, Leu und
Met und Met und Tyr, Trp und His und Trp und
Gln, His und Trp und Gln und Trp, Trp und Gln
und Trp und Thr, Gln und Trp und Thr und Pro,
Trp und Thr und Pro und Trp, Thr und Pro und
Trp und Ser, Pro und Trp und Ser und Ile, Trp
und Ser und Ile und Gln, Ser und Ile und Gln
und Pro.

15

20

25

5 D) Val und Asp und Met und Ile und Asn, Asp und
Met und Ile und Asn und Asp, Met und Ile und
Asn und Asp und Val, Ile und Asn und Asp und
Val und Gln, Asn und Asp und Val und Gln und
Pro, Asp und Val und Gln und Pro und Leu, Asn
und Asp und Val und Gln und Pro, Asp und Val
und Gln und Pro und Leu, Val und Gln und Pro
und Leu und Thr, Gln und Pro und Leu und Thr
und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser und Arg,
10 Arg und His und Ala und Thr und Tyr, Leu und
Lys und Ala und Thr und Thr, Lys und Ala und
Thr und Thr und Asn, Ala und Thr und Thr und
Asn und Ser, Thr und Thr und Asn und Ser und
Lys, Thr und Asn und Ser und Lys und Leu, Asn
15 und Ser und Lys und Leu und Met, Ser und Lys
und Leu und Met und Met, Lys und Leu und Met
und Met und Tyr, Trp und His und Trp und Gln
und Trp, His und Trp und Gln und Trp und Thr,
20 Trp und Gln und Trp und Thr und Pro, Gln und
Trp und Thr und Pro und Trp, Trp und Thr und
Pro und Trp und Ser, Trp und Thr und Pro und
Trp und Ile, Thr und Pro und Trp und Ile und
Gln, Pro und Trp und Ile und Gln und Pro.

25 E) Val und Asp und Met und Ile und Asn und Asp,
Val und Gln und Pro und Leu und Thr und Pro,
His und Ser und Pro und Leu und Asp und Ser,
Ser und Arg und His und Ala und Thr und Tyr,
Leu und Lys und Ala und Thr und Thr und Asn,
Lys und Ala und Thr und Thr und Asn und Ser,
30 Ala und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys,

Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und Leu,
Thr und Asn und Ser und Lys und Leu und Met,
Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met,
Ser und Lys und Leu und Met und Met und Tyr,
Trp und His und Trp und Gln und Trp und Thr,
Trp und Gln und Trp und Thr und Pro und Trp,
Trp und Thr und Thr und Pro und Trp und Ser
und Ile, Pro und Trp und Ser und Ile und Gln
und Pro.

5
10
15
20
25
F) Asp und Val und Gln und Pro und Leu und Thr
und Pro, Leu und Asp und Ser und Ser und Arg
und His und Ala, Ser und Ser und Arg und His
und Ala und Thr und Tyr, Leu und Lys und Ala
und Thr und Thr und Asn und Ser, Lys und Ala
und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys, Ala
und Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und
Leu, Thr und Thr und Asn und Ser und Lys und
Leu und Met, Thr und Asn und Ser und Lys und
Leu und Met und Met, Asn und Ser und Lys und
Leu und Met und Met und Tyr, Trp und His und
Trp und Gln und Trp und Thr und Pro, Gln und
Trp und Thr und Pro und Trp und Ser und Ile,
Thr und Pro und Trp und Ser und Ile und Gln
und Pro.

G) Mindestens zwei Komponenten aus mindestens
einer der Gruppen A) bis F).

H) Sequenzen 1 - 27 des Sequenzprotokolls, wel-
che alle 12 Aminosäuren mit den Positionen 1
- 12 umfassen.

- I) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1, 2, 3 und 4 die Aminosäuren Leu, Lys, Ala, und Thr beinhalten.
- J) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 6, 7, 8 und 9 die Aminosäuren Asn, Ser, Lys und Leu besitzen.
- K) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination der Merkmale I) und J) beinhalten.
- L) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 4, 5 und 6 die Aminosäuren Gln, Trp und Thr besitzen.
- M) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 8 und 9 die Aminosäuren Arg und His besitzen.
- N) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 11 und 12 die Aminosäuren Thr und Tyr besitzen.
- O) Alle Unterkombinationen mit 2 oder 3 Elementen der Gruppen L), M) und N).
- P) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 1 und 2 die Aminosäuren Val und Tyr besitzen.
- Q) Aminosäuresequenzen, die in den Positionen 7, 8, 9, 10, 11, 12 die Aminosäuren Arg, Pro, Leu, Pro, Ser und Pro besitzen, K Asn und Ser und Lys und Leu und Met und Met.

R) Aminosäuresequenzen, die eine Kombination aus
N) und O) darstellen.

2. Mittel nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
5 dass es in fester, halbflüssiger oder flüssiger
Form vorliegt.
3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass es in Form von Injektionslösungen, Tropfen,
Säften, Sirupen, Spray, Suspensionen, Granula-
ten, Tabletten, Pellets, transdermalen therapeuti-
schen Systemen, Kapseln, Pflastern, Zäpfchen, Sal-
ben, Cremes, Lotionen, Gelen, Emulsionen oder Aero-
solen vorliegt.
- 15 4. Mittel nach Anspruch 3
dadurch gekennzeichnet,
dass es Hilfsstoffe, wie z. B. Trägermaterialien,
Füllstoffe, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel, ober-
flächenaktive Stoffe, Farbstoffe, Konservierungs-
20 stoffe, Sprengmittel, Gleitmittel, Schmiermittel,
Aromen und/oder Bindemittel enthält.
5. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass es mit mindestens einer Komponente aus der
Gruppe Zuckerreste, Glukoronsäuren, Sulfatreste,
Serin, Glycin oder Aspartat modifiziert bzw. sub-
stituiert sind.

6. Nukleinsäure, kodierend für die Peptide nach Anspruch 1.
7. Nukleinsäure nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
5 dass sie eine DNA, eine RNA, eine mRNA oder eine Mischung aus mindestens zwei Komponenten davon ist.
8. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,
10 dass sie als nackte Nukleinsäure oder verpackte Nukleinsäure, als Vektor, Plasmid, in Liposomen eingebunden oder als Phage vorliegt.
9. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
15 dass eine Festphasensynthese oder eine Synthese in flüssiger Phase eingesetzt wird.
10. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass ein Peptid nach Anspruch 1 aus einer für diese Peptidsequenz kodierenden Nukleinsäure exprimiert wird.
11. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels.
- 25 12. Heil- und Behandlungsverfahren sowie Verfahren zur Prävention der Krankheit TSE,
dadurch gekennzeichnet,

27

dass an den Patienten ein Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 5 und/oder eine Nukleinsäure nach den Ansprüchen 6 bis 8 verabreicht wird.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Mittel und Verfahren zur Behandlung und Prävention von TSE, sowie Verfahren zur Herstellung des Mittels

5 Die Erfindung betrifft ein Mittel bzw. einen pharmazeu-
tischen Wirkstoff und ein Verfahren zur Behandlung,
Prävention und Diagnose von TSE, sowie ein Verfahren
zur Herstellung des Mittels bzw. pharmazeutischen Wirk-
stoffes. Erfindungsgemäß werden Peptide bzw. für diese
Peptide kodierende Nukleotidsequenzen zur Verfügung ge-
stellt, welche in den Sequenzprotokollen 1 bis 27 sowie
Teilsequenzen davon offenbart sind.

10 Mit den erfindungsgemäßen Peptiden kann eine Behandlung
oder Prävention der Krankheit TSE zum Beispiel beim
Menschen Creutzfeld-Jakob-Syndrom, Kuru, Gerstmann-
Sträussler-Scheinker-Syndrom und FFI (Fatal Familial
Insomnia) vorgenommen werden. Beim Tiere sind TSE-
15 Erkrankungen bekannt, beim Schaf Scrapie, beim Rind BSE
und bei Wildtieren CWD.

28

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungszentrum Juelich GmbH

<120> Mittel und Verfahren zur Behandlung und Prävention von
TSE, sowie Verfahren zur Herstellung des Mittels

<130> PT1.2095

<140>

<141>

<160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 1

Leu Lys Ala Thr Thr Asn Ser Lys Leu Met Met Tyr
1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 2

Val Asp Met Ile Asn Asp Val Gln Pro Leu Thr Pro
1 5 10

<210> 3

<211> 12

29

<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 3
Val Asp Met Ile Asp Asp Val Gln Pro Leu Thr Pro
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 4
Val Asp Met Ile Asn Asp Val Gln Pro Met Thr Pro
1 5 10

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 5
Val Tyr Met Met Asn Asn Gly Gln Pro Pro Ser Pro
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 6

Val Asp Met Ile Asn Asp Val Gln Pro Met Ser Pro

1 5 10

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 7

Trp His Trp Gln Trp Thr Pro Trp Ser Ile Gln Pro

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 8

His Ser Pro Leu Asp Ser Ser Arg His Ala Thr Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

31
<400> 9

His Tyr Thr Leu Asp Ser Cys Arg His Pro Thr Tyr
1 5 10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 10

Val Tyr Ser Ser Thr Thr Arg Pro Leu Pro Ser Pro
1 5 10

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 11

Val Tyr Ser Ser Asn Thr Arg Pro Leu Pro Ser Pro
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 12

Val Tyr Ser Ser Asn Asn Arg Pro Leu Pro Ser Pro

1 5 10

<210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 chemische Synthese

<400> 13
 Val Tyr Leu Leu Asn Asn Arg Pro Leu Pro Ser Pro
 1 5 10

<210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 chemische Synthese

<400> 14
 Val Tyr Leu Leu Ser Thr Arg Pro Leu Pro Ser Pro
 1 5 10

<210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 chemische Synthese

<400> 15
 Val Tyr Trp Pro Thr Asn Arg Pro Leu Pro Ser Pro
 1 5 10

23

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 16
Val Gln Pro Ser Ile Asn Arg Pro His Gln Arg Pro
1 5 10

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 17
Tyr His Asn Tyr Thr Thr Ala Pro His Ser Pro Ser
1 5 10

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 18
Lys Pro Val Ile Ser Pro Thr Asn Ala Leu Gln Pro
1 5 10

<210> 19
<211> 12

<212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 chemische Synthese

 <400> 19
 Val Thr Gly Pro Thr Lys Asn Leu Pro Ala Thr Thr
 1 5 10

<210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 chemische Synthese

<400> 20
 Ala Ser His Val Asp Tyr Arg Arg Phe Leu Leu Thr
 1 5 10

<210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 chemische Synthese

<400> 21
 Asp Gln Asp Phe Ala Pro Asp Arg His Tyr Arg Leu
 1 5 10

<210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 22

Gln Lys Trp Pro Glu Thr Tyr Pro Asp Leu Ser Phe
1 5 10

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 23

Gly Asp Pro Val Pro Gln Thr Tyr Ser Ala Ala Gly
1 5 10

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 24

Ala Val Ser Val Asn Thr Lys Ile Asp Thr Glu Ala
1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 25

Gln Pro Asn Tyr Thr Ser Leu Leu Tyr Gly Thr Ala
1 5 10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 26

Thr Gln Pro Pro Ile His His Tyr Gln Leu Pro Ala
1 5 10

<210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
chemische Synthese

<400> 27

Gly Trp Asp His Ile His Gly Val His Gln His Val
1 5 10

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.